

Efecto del magnesio en el crecimiento y producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*

Effect of magnesium on the growth and production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*

Mirna Yaniva Rodriguez-Barrantes¹

Recibido: 20 de marzo de 2018
Aceptado: 30 de marzo de 2018

RESUMEN

En la presente investigación se determinó el efecto del magnesio 0,059; 0,118; 0,236 y 0,472 mg/L en el crecimiento y la producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 en cultivo de lote alimentado a pH 5.5, para lo cual se utilizó Caldo Sabouraud Sacaroso suplementado con magnesio a diferentes concentraciones. La incubación se llevó a cabo en biorreactores cilíndricos con cuatro buflés y tapas de microporoso, los cuales estuvieron conectados a un sistema de aireación conformado por una aireador de acuario que insufló aire para cada biorreactor, el mismo que antes de ingresar a los biorreactores fue previamente purificado mediante pasajes sucesivos a través de dos frascos conteniendo uno de sulfato de cobre al 5% y otro una solución de cloruro de sodio al 23%. Esta suministración de aire se hizo solo durante la evaluación de crecimiento. Los datos de crecimiento se obtuvieron por recuento en Cámara de Neubauer, y se realizó cada cuatro horas durante 28 horas de incubación. En la etapa de fermentación alcohólica se cuantificó el número de células sobrevivientes y la producción de etanol cada 8 y 24 horas durante 96 horas. En ambos casos se midió el pH, temperatura y porcentaje de azúcares totales. Los resultados indican un mayor crecimiento y producción de etanol a la concentración de magnesio de 0.472 mg/L, sin embargo la diferencia no es significativa según los análisis estadísticos realizados. En base a los resultados obtenidos y al análisis correspondiente, se concluye que las concentraciones de magnesio de 0,059; 0,118; 0,236 y 0,472 mg/L no influyen significativamente en la producción de biomasa, ni de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, etanol, magnesio.

ABSTRACT

In the present investigation the effect of the Magnesium decided 0,059; 0,118; 0,236 and 0,472 mg/L in the growth and the production of ethanol for *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 in culture of lot alimentadoa pH 5.5, for which Sabouraud Sacaroso was in use Broth suplementado with magnesium to different concentrations, the incubation I carry out in biorreactores cylindrical of glass with four buflés and you cover of microporous, which were connected to a system of aeration shaped by an aireador of aquarium that blew air for every biorreactor, the same one that before depositing the biorreactores was before purified by means of successive passages across two flasks containing one of sulfate of copper to 5 % and other one a solution of chloride of sodium to 23 %. This suministración of air was done only during the evaluation of growth. The information of growth was obtained by inventory in Neubauer's Chamber, and it was realized every four hours for 28 hours of incubation. In the stage of fermentation alcoholic there was quantified the number of surviving cells and production of ethanol every 8 and 24 hours for 96 hours. In both cases the pH measured up, temperature and percentage of azúcares total. The results indicate a major growth and production of ethanol to the concentration of Magnesium of 0.472 mg/L, nevertheless the difference is not significant according to the statistical realized analyses. On the basis of the obtained results and the corresponding analysis, one concludes that the concentrations of magnesium of 0,059; 0,118; 0,236 and 0,472 mg/L do not influence significantly the production of biomass, not of ethanol for *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol, magnesium.

¹ Maestro en ciencias con mención en microbiología clínica - Universidad Privada Antenor Orrego

INTRODUCCIÓN

Las levaduras son el grupo microbiano más importante que el hombre explota comercialmente. Su importancia económica radica en la capacidad de ciertas levaduras de efectuar una rápida y eficiente fermentación alcohólica, convirtiendo los azúcares fundamentalmente a etanol y dióxido de carbono¹. Actualmente solo *Saccharomyces cerevisiae* y algunas especies relacionadas son de gran importancia industrial, por su capacidad para asimilar y fermentar un amplio rango de azúcares, como sacarosa, glucosa, fructosa, galactosa, maltosa y maltotriosa².

El Perú es un país que posee gran potencial para el desarrollo de industrias biotecnológicas, por lo que en la actualidad cuenta con bioindustrias fermentativas tradicionales como son las industrias vinícolas, cerveceras y destilerías de alcohol, las que requieren permanentemente el empleo de levaduras debidamente seleccionadas y caracterizadas.

Es importante analizar el crecimiento de los microorganismos a nivel de laboratorio, ya que este puede ser determinante durante la etapa fermentativa. Trevan y colaboradores en 1990 reportaron que las células de levaduras, utilizadas en la industria se han producido comercialmente desde principios de siglo³. La producción de biomasa de levaduras es posible si al microorganismo se le proporciona todos los nutrientes necesarios para el incremento de la masa celular y para asegurar el aporte energético necesario. Esta nutrición se hace teniendo en consideración bases técnicas y económicas tales como las funciones fisiológicas del nutriente, costo, disponibilidad y el control del medio ambiente para lograr la optimización del proceso⁴.

Muchas cepas de *S. cerevisiae* pueden producir etanol hasta una concentración de 12-14%. Existe un cierto interés en el empleo de levaduras tolerantes de cantidades elevadas de alcohol en los procesos de fabricación de bebidas alcohólicas y en la producción de alcohol para destilación con vistas a incrementar la productividad de la planta y disminuir los costos de destilación. También existen cepas seleccionadas capaces de producir hasta un 18-20% de alcohol, aunque la velocidad de fermentación se ve fuertemente reducida cuando la concentración de etanol aumenta⁵.

Las levaduras normalmente utilizadas en los procesos industriales de producción de etanol, están limitadas a producir hasta donde su osmotolerancia al etanol lo permite, por esta razón las fermentaciones alcohólicas son llevadas a cabo utilizando bajas concentraciones de azúcar, usualmente < 20% w/v². Además la alta concentración de azúcar inicial disminuye la actividad y transporte de azúcar por las levaduras, produciendo un menor volumen de etanol^{2,6}.

En la fermentación en batch (cultivo no continuo), las tasas de glicolisis y de producción de etanol, por unidad de proteína celular, son muy elevadas en las etapas iniciales, para descender progresivamente, a medida que el etanol producido comienza a acumularse en el medio de cultivo⁴. Este descenso comienza a concentraciones extracelulares de etanol relativamente bajas entre 1% y 2% (p/v), cuando el etanol extracelular alcanza una concentración del 5%, tiene lugar una pérdida del 50% de la actividad metabólica⁷.

El descenso en la actividad fermentativa coincide con la transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria de crecimiento⁶, y esta transición supone numerosos cambios fisiológicos, pues la maquinaria celular cambia de una actividad biosintética intensa a una actividad fundamentalmente de mantenimiento⁷.

Desde el aislamiento de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 por Granados en 1990 en el laboratorio de microbiología industrial de la Universidad Nacional de Trujillo¹⁰, este ha sido objeto de diversos estudios debido a su elevada capacidad para producir etanol. Villanueva en 1995 estudió la concentración óptima de azúcar, tiempo y concentración de inóculo en la producción de hidromiel⁹, Olivares en 1996 mejoró su rendimiento fermentativo usando luz UV¹⁰, Salazar en 1996 determinó su desarrollo reproductivo y fermentativo en mosto de melaza¹¹ y Pereda en 1999 demostró la influencia de diferentes fuentes nitrogenadas sobre su velocidad de crecimiento¹². Además se tiene reportada la producción de etanol¹³ sobre distintos sustratos por *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51.

En la actualidad, debido a la creciente demanda de etanol se busca incrementar su nivel de producción y disminuir costos. La reducción de costos durante el downstream puede lograrse si

se obtiene una mayor concentración de etanol, por lo que las últimas investigaciones están orientadas a alcanzar este objetivo y así disminuir costos para una mayor rentabilidad¹⁴. El incremento de la tolerancia de la levadura al etanol esto se traduce en una mayor producción.

Las levaduras poseen muchas características fisiológicas como la respiración y la nutrición, las cuales contribuyen a su éxito como microorganismos industriales. Para que la levadura se multiplique activamente y en buenas condiciones, es preciso administrarles aire, por el oxígeno que contiene, y alimentos como materias hidrocarbonadas, materias nitrogenadas y sales minerales como el sulfato de magnesio¹⁵.

Los iones de magnesio juegan un rol esencial en el crecimiento y metabolismo de las levaduras^{16, 17}. En el catabolismo de carbohidratos y la fermentación alcohólica, los iones de magnesio son requeridos como cofactores para actividades glicolíticas y para activar enzimas en la fermentación y también tienen importancia en la regulación de enzimas en el metabolismo del piruvato durante el crecimiento aeróbico de las levaduras. Las levaduras se encuentran sometidas a estrés durante el periodo de fermentación¹⁸. El ión de magnesio también juega un rol en la protección de las células de las levaduras frente al estrés que representan los factores fisicoquímicos del medio ambiente durante la fermentación, como el etanol producido^{6, 19, 20, 21, 22}, las altas temperaturas y la alta presión osmótica.

Dombeck e Ingram demostraron que la deficiencia de magnesio en una levadura fue el principal responsable en el declive de la actividad metabólica de la levadura⁷. Además, se ha observado una estimulación en la producción de etanol cuando la melaza, vino o malta son suplementados con magnesio, indicando esto que puede ser debido a una deficiencia de magnesio para una óptima fermentación^{6, 23}. Por lo tanto, la disponibilidad media de magnesio que toma la levadura y la utiliza posteriormente es necesario para lograr una máxima actividad fermentativa.

La absorción de magnesio se lleva a cabo en dos etapas¹⁷. En la primera etapa, durante la fase Lag cada célula de levadura acumula el de ión magnesio en su interior¹⁷. Este es adsorbido por los grupos aniónicos en la superficie de

la pared celular y utilizado en el metabolismo respectivamente y lo va liberando poco a poco durante el proceso de fermentación^{23, 24, 25}. La segunda etapa es independiente del metabolismo, un proceso más lento que el primero y se le llama bioacumulación. Esta etapa está conectada a un transporte activo de magnesio a través de la pared y membrana citoplasmática hacia el interior de la célula^{24, 25, 26, 27}. Poreda Aleksander y colaboradores encontraron que las levaduras en el primer "batch" de fermentación tienen una mayor concentración de iones de magnesio en su interior, la cual va disminuyendo en cada proceso fermentativo que reutiliza la levadura¹⁷.

En la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y etanol es muy utilizado el proceso de lote alimentado⁸. La utilización del lote alimentado en esta investigación para la producción de etanol permitió medir la tolerancia de *S. cerevisiae* MIT-L51 frente al estrés ocasionado por el etanol producido durante la fermentación.

Los procesos fermentativos para la producción de etanol se han usado por siglos y los mecanismos metabólicos involucrados se han conocido desde varias décadas atrás. Sin embargo, muchos aspectos microcinéticos de la producción de etanol no están completamente claros. El etanol producido por las levaduras tiene un amplio uso, como insumo en diversas industrias o como combustible con fines energéticos, lo cual ha hecho que las levaduras sean cuantitativamente y económicamente el grupo de microorganismos más importantes comercialmente explotado por el hombre^{28, 29, 30}.

El amplio y creciente interés en el etanol y el renacimiento de la fermentación como un medio complementario a la industria química, debido a la limitada disponibilidad del petróleo como recurso y la incertidumbre en sus precios, han impulsado la necesidad de investigar más profundamente los diversos parámetros involucrados en su producción por las levaduras²⁸.

S. cerevisiae es la levadura de mayor interés y aplicación en la producción de biomasa y etanol a nivel industrial. Estas levaduras tienen la capacidad de producir etanol pero, al mismo tiempo, una limitada osmotolerancia al mismo, lo cual limita su producción, ya que, al sobrepasar este límite, la elevada concentración de etanol

en el medio extracelular destruye su membrana y pared celular, ocasionando la muerte de las levaduras. Por este motivo, esta investigación está orientada a determinar el efecto del magnesio en el crecimiento y la producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 para incrementar su osmotolerancia y que, por consiguiente, pueda fermentar una mayor cantidad de azúcar, logrando así una mayor producción de biomasa y etanol en sistemas de lote alimentado. Se espera que a mayor concentración de sulfato de magnesio haya un mayor crecimiento y producción de etanol por la levadura.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Material biológico

Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 proporcionado por el laboratorio de microbiología industrial del Departamento Académico de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.

1.2. Medios de cultivo (Anexo 01)

- Agar Sabouraud Sacarosado (ASS)
- Caldo Saboraud Sacarosado (CSS)

2. MÉTODO

2.1. Reactivación del cultivo

A partir de un cultivo de *S. cerevisiae* MIT-L51 se preparó una suspensión y se realizó una coloración Gram para confirmar su pureza. Luego, se preparó una suspensión en agua destilada estéril (ADE), se sembró por superficie en frascos conteniendo ASS y se incubó a temperatura ambiental ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 24 horas.

2.2. Preparación y estandarización del inóculo

Del cultivo reactivado de *S. cerevisiae* MIT-L51 se sembró en frascos que contienen ASS y se incubó en la estufa a 30°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, la biomasa desarrollada se "cosechó" utilizando ADE y se cuantificó mediante recuento de viables en cámara de Neubauer y se estandarizó a 1.6×10^7 cel/mL.

2.3. Acondicionamiento de biorreactores (Anexo 02)

Se utilizaron cinco biorreactores cilíndricos aireados de 500 mL de capacidad, a los cuales se les acondicionó cuatro deflectores de vidrio y tapas de jebe microporoso. Los biorreactores fueron higienizados y esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos. Finalizada la esterilización quedaron listos para ser utilizados.

El sistema de aireación estuvo constituido por una aireador de acuario que insufló aire en la cantidad de 0.25 vvm para cada biorreactor. El aire antes de ingresar a los biorreactores fue previamente purificado mediante pasajes sucesivos a través de dos frascos conteniendo uno de sulfato de cobre "Dropaksa" al 5% y otro una solución de cloruro de sodio (sal común) al 23%.

2.4. Producción de biomasa

Para la producción de biomasa se empleó CSS suplementado con fuente de nitrógeno, de carbono y de magnesio.

2.4.1. Suplementación del medio con fuente de nitrógeno y de carbono

A los cinco biorreactores se les adicionó medio de cultivo suplementado 0.5 % de levadura de panificación "Fleishman" previamente procesada, como fuente de nitrógeno (anexo 03) y azúcar rubia doméstica al 4%, como fuente de carbono.

2.4.2. Suplementación del medio con magnesio

A los biorreactores 1, 2, 3 y 4 se añadió sulfato de magnesio heptahidratado (Merk) a las concentraciones de 6, 12, 24 y 48 mg/L que corresponden a 0,059; 0,118; 0,236 y 0,472 mg. de magnesio por litro de caldo respectivamente. Al biorreactor N°1 no se le adicionó magnesio y fue utilizado como testigo.

2.4.3. Inoculación en los biorreactores

A cada uno de los cinco biorreactores que contienen 400 mL de medio de cultivo, se le adicionó 5 mL de la suspensión de levadura previamente estandarizada.

Los biorreactores inoculados fueron incubados durante 32 horas a temperatura ambiental ($26 \pm 1^\circ\text{C}$).

2.4.4. Monitoreo

El monitoreo se realizó cada cuatro horas durante las 28 horas de incubación. Para ello, en cada muestreo se extrajo 0.5 mL de medio de cultivo. La biomasa viable se cuantificó mediante recuento en cámara de Neubauer, utilizando azul de metileno. Se hicieron diluciones decimales en ADE cuando fue necesario (anexo 04).

2.5. Producción de etanol

Culminada la determinación del crecimiento celular, a los cinco biorreactores se les desconectó el sistema de aireación con la finalidad de iniciar el proceso de fermentación. Se midió la concentración de azúcares totales y se les adicionó azúcar rubia doméstica hasta obtener 10% de azúcares totales.

2.5.1 Acondicionamiento de los sistemas de lote alimentado

Adicionado el azúcar, se les proporcionó condiciones de fermentación; para ello, a los cinco biorreactores se les retiró los sistemas de aireación.

Cuando el porcentaje de azúcar disminuyó hasta 5% se les adicionó una azúcar rubia doméstica hasta alcanzar el 10% de azúcares totales. Esta alimentación se llevó a cabo durante 96 horas.

2.5.2 Monitoreo durante la producción de etanol

Antes de la fermentación, se midió en cada biorreactor los valores iniciales de pH, los porcentajes de azúcares totales y el número de células viables por mililitro de medio.

La fermentación se llevó a cabo durante las 96 horas a temperatura ambiental ($26\pm 1^\circ\text{C}$). Cada 24 horas se midió el valor del pH (anexo 05), el porcentaje de azúcares totales y el grado alcohólico (Anexo 06), utilizando una cinta de pH, refractómetro y alcoholímetro, respectivamente.

2.5.3 Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos del crecimiento y de la producción de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 por efecto del magnesio se organizaron en tablas, se graficaron y se analizaron estadísticamente utilizando el paquete estadístico SPSS 17.0.

RESULTADOS

Al evaluar la influencia del magnesio bajo la forma de sulfato de magnesio a diferentes concentraciones sobre el crecimiento y producción de alcohol por *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 se encontraron los siguientes resultados.

En la **figura 1** se presentan las curvas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51, en biorreactores aireados conteniendo CSS suplementado con sulfato de magnesio a diferentes concentraciones, incubados a temperatura ambiental (26 ± 1) durante 28 horas. Se observa un crecimiento similar en las cuatro concentraciones de magnesio; sin embargo, se aprecia un mayor crecimiento en el biorreactor suplementado con magnesio.

La **figura 2** muestra gráficamente las curvas de sobrevivientes de *S. cerevisiae* MIT-L51, obtenidas mediante recuento en Cámara de Neubauer durante 96 horas de fermentación alcohólica. Se evidencia un mayor número de sobrevivientes en la mayor concentración de magnesio.

En la **figura 3** se muestran los valores promedio de etanol (%) producido durante 96 horas de fermentación en CSS. Se observa que los porcentajes de etanol más altos se presentan a mayor concentración de magnesio.

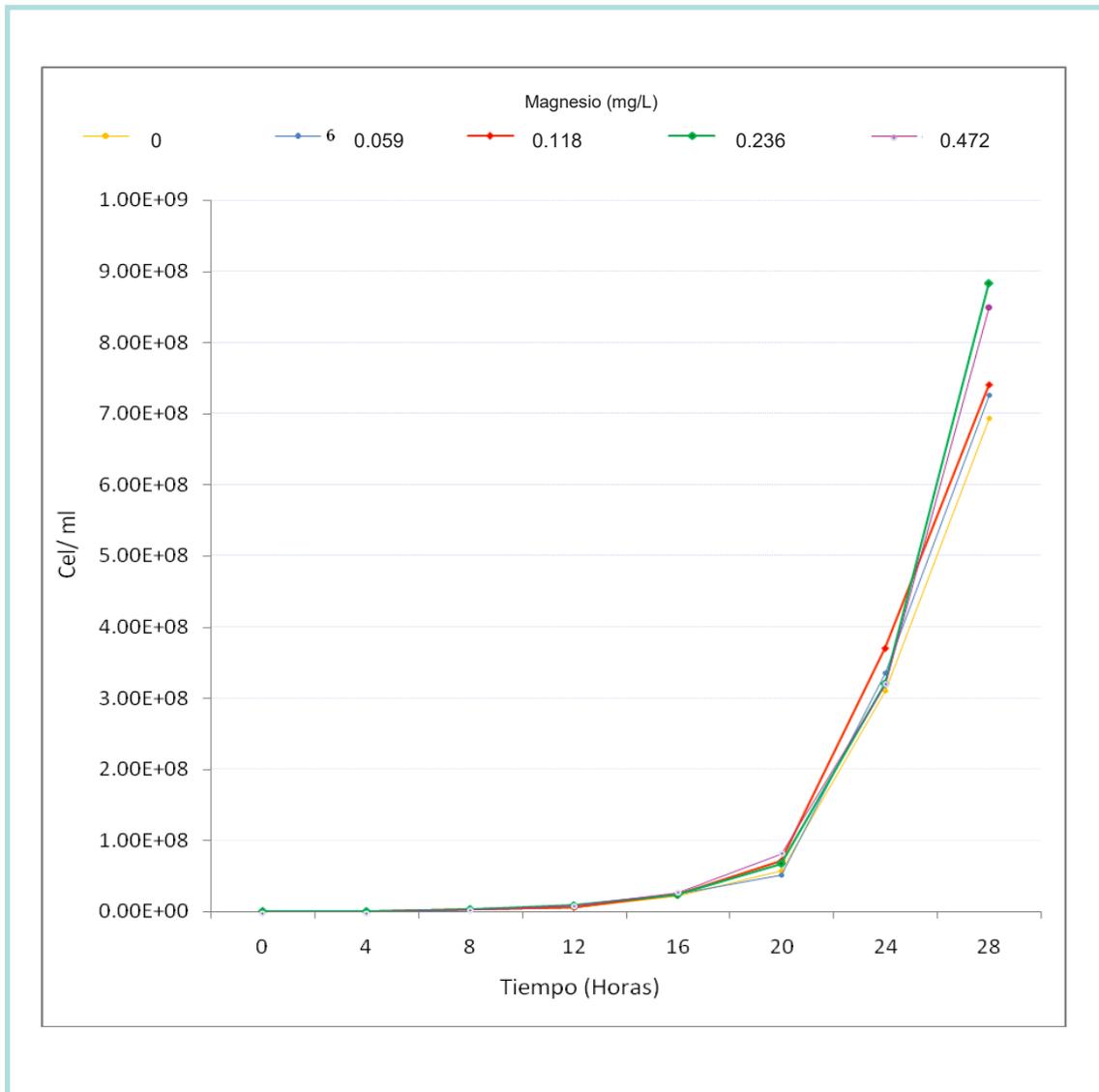


Figura 1. Curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 en caldo Saboraud sacarosado suplementado con magnesio a diferentes concentraciones, en biorreactores aireados. La incubación se realizó a temperatura ambiental (26 ± 1) durante 28 horas y los recuentos se realizaron en cámara de Neubauer utilizando azul de metileno.

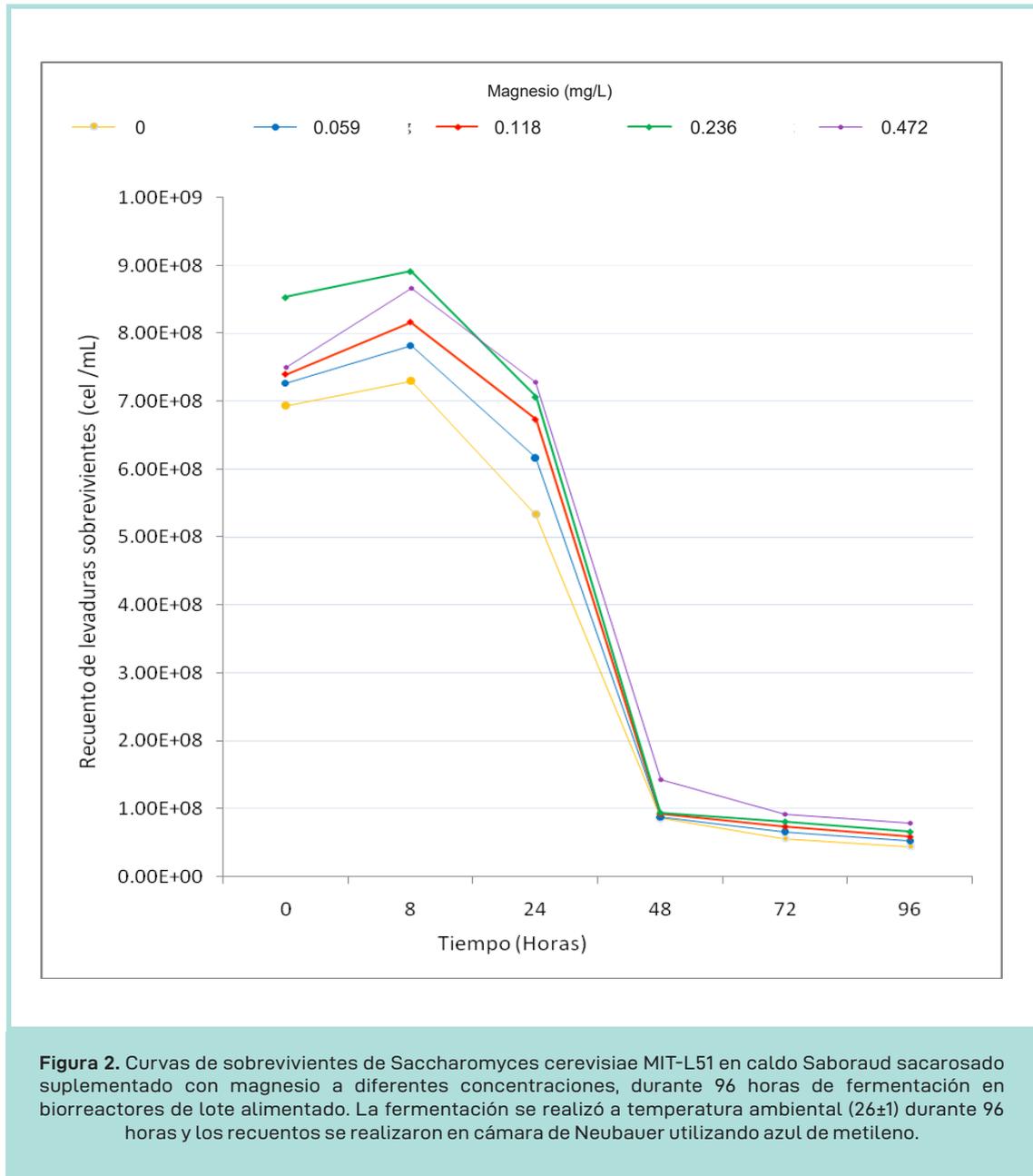
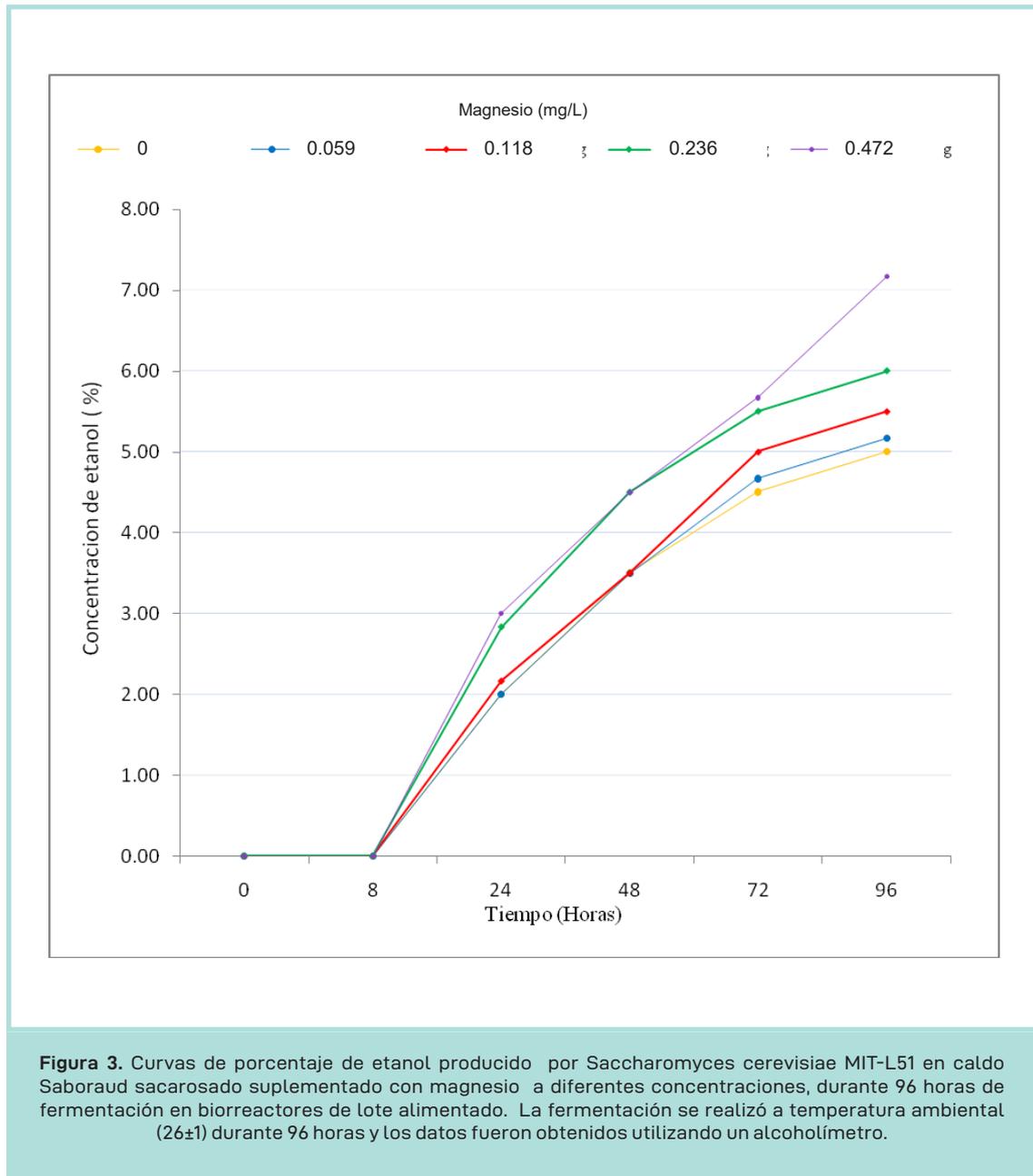


Figura 2. Curvas de sobrevivientes de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 en caldo Saboraud sacarosado suplementado con magnesio a diferentes concentraciones, durante 96 horas de fermentación en biorreactores de lote alimentado. La fermentación se realizó a temperatura ambiental (26 ± 1) durante 96 horas y los recuentos se realizaron en cámara de Neubauer utilizando azul de metileno.



DISCUSIÓN

Las levaduras crecen en un medio de cultivo solo si este contiene todos los nutrientes necesarios en una forma disponible, tanto para la síntesis del material celular como para la producción de metabolitos; también es necesario que los factores ambientales sean adecuados^{3, 32}. Un medio de cultivo balanceado debe incluir una combinación de fuentes de carbono y nitrógeno, macroelementos, microelementos y factores de crecimiento⁴.

Para la producción de biomasa en CSS a diferentes concentraciones de sulfato de magnesio, se tuvieron en cuenta las mismas condiciones físicas y químicas durante la incubación, solo se varió la suplementación de magnesio. Los resultados de la gráfica indican que al suplementar con una mayor concentración de magnesio (0,472mg/L) se presentó un mayor crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 (Fig. 1). Así se puede apreciar que se produce mayor biomasa a dicha concentración, esto en relación con las concentraciones menores utilizadas en las que se aprecia que la biomasa decrece conforme disminuyen las concentraciones de magnesio (Fig.1 y anexo 05). Sin embargo, es visible un aumento progresivo de la biomasa en todos los cultivos analizados. Esto se explica en base a las siguientes consideraciones: a la ausencia de fase de latencia, pues se observó un crecimiento inmediato a la inoculación porque la levadura se encontraba en fase logarítmica; a la aireación, la misma que presenta doble ventaja que es aportar oxígeno para la respiración lo que favorece la multiplicación de las levaduras y eliminar el CO₂ producido por el metabolismo de los sustratos carbonados, que podría inhibir el crecimiento y favorecer la fermentación; y finalmente a la composición del mosto que contiene nutrientes adecuados^{32, 33}.

La producción de biomasa si bien es cierto que aumenta a mayor tiempo de incubación, está favorecida al suplementar el medio con una mayor concentración de magnesio, la misma que se pone en evidencia en la fase logarítmica. Esto se explica porque dicha fuente de magnesio es fácilmente asimilado por las levaduras, lo que conlleva a un mayor crecimiento; por lo que al encontrarse en mayor cantidad favorecen el crecimiento^{33, 34, 35}. Aunque el análisis estadístico de la producción de la biomasa (anexo 09 y 10) indicó que las diferentes concentraciones de magnesio no influyen significativamente en la producción de biomasa.

El uso de sulfato de magnesio como fuente mineral es importante ya que éste es asimilable por las levaduras interviniendo así en el crecimiento y metabolismo de la de las levaduras^{15, 16}. Además, en el catabolismo de carbohidratos y fermentación alcohólica, los iones de magnesio son requeridos como cofactores para actividades glicolíticas y para activar enzimas en la fermentación y también tienen importancia en la regulación de enzimas en el metabolismo del piruvato durante el crecimiento aeróbico de las levaduras¹.

Durante la producción de etanol se observó el número de levaduras sobrevivientes más elevado en el biorreactor suplementado con 0,472 mg/L de Sulfato de magnesio al que le corresponde un equivalente de 0,472mg/L de magnesio (Fig.2 y anexo 07), aunque estadísticamente no hubo diferencia significativa (anexo 10 y 11). Este proceso se llevó a cabo en el mismo medio de cultivo usado inicialmente para el crecimiento de las levaduras, adicionándose en este caso la misma cantidad de azúcar en cada biorreactor, pues el azúcar del CSS fue usado por las levaduras durante la etapa de crecimiento con aireación. La adición de azúcar según el modelo de lote alimentado al CSS, favorece la fermentación alcohólica, en virtud de la cual el azúcar presente se transforma bajo la acción de enzimas generadas por las levaduras en alcohol y anhídrido carbónico³⁶. Este proceso de fermentación alcohólica es beneficiado por la adición de magnesio durante la etapa de crecimiento, ya que es en ella cuando las levaduras incorporan los iones de magnesio a través de su pared y membrana celular y son utilizados en el metabolismo, liberándolos poco a poco durante el proceso de fermentación^{22,23,24}. De esta manera, se asegura la capacidad fermentativa de las levaduras, es decir, que la fermentación no termine de inmediato, sino al cabo de varios días, además le confiere protección a la levadura frente al estrés producido por el medio ambiente y el etanol producido por él mismo. Así se observa un mayor número de sobrevivientes en el biorreactor que contiene la mayor concentración de magnesio (Fig.2). Sin embargo, la ausencia de oxígeno en este proceso conlleva a una escasa multiplicación de las levaduras durante la fermentación^{15, 36}. Este descenso durante la actividad fermentativa coincide con la transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria de crecimiento⁴, y esta transición supone numerosos cambios fisiológicos, pues la maquinaria celular cambia de una actividad biosintética intensa a una actividad, fundamentalmente, de mantenimiento⁵.

En el CSS de cada biorreactor durante los cuatro días de fermentación se determinó el porcentaje de alcohol y adicionalmente se hicieron mediciones de algunos parámetros como el valor del pH (Anexo 06) y el porcentaje de azúcares totales.

Los resultados de producción de etanol indican en la gráfica una mayor producción en el reactor cinco con la concentración inicial equivalente solo de magnesio de 0.472 mg/L (Fig.3 y anexo 07), aunque el análisis estadístico (anexo 12y 13) indica que las diferentes concentraciones de sulfato de magnesio no influyen significativamente en la producción de etanol. Esto ocasionado probablemente por la disminución del valor de pH en el transcurso de la fermentación (anexo 06), debido a que el CSS al presentar una baja cantidad de nutrientes como compuestos nitrogenados permite que *S. cerevisiae* MIT-L51 use compuestos carbonados, por lo que descender dichos compuestos como el azúcar se aprecia una mayor acidez³⁶. La deficiencia de compuestos nitrogenados es desfavorable para el crecimiento y actividad fermentativa de las levaduras, siendo esta última menor a pH bajo⁵.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos y al análisis correspondiente, se concluye que las concentraciones de magnesio de 0,059; 0.118; 0,236 y 0.472 mg/L no influyen significativamente en la producción de biomasa, ni de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stewart, G and I. Russel. Yeast Genetics: Fundamental and Applied Aspects. Spencer Editors. New York: 1983.
2. Lawford, G.; B. Lavers; D. Good; R. Charley and J. Fein. Ethanol from Biomass. Royal Society of Canada. Ottawa: 1980.
3. Trevan, M.; S. Boffey; K. Goulding Y P. Stambury. Biotecnología: Principios biológicos. Edit. Acribia S.A. Zaragoza. España. 1990
4. Pellon, J. La Ingeniería Genética y sus Aplicaciones. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza. España. 1986.
5. Ward, O. Biotecnología de la Fermentación. Principios, Procesos y Productos. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza. España. 1991.
6. Walker, G. M. and Maynard, A. I., Accumulation of magnesium ions during fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol.1997; 18:1-3.
7. Dombek, K. M. & Ingram, L. O. Magnesium Limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. Applied envirom. Microbiol. 1986; 52: 975.
8. Granados, H.. Capacidad Fermentativa de la Levadura aisladas de frutos de *Vitis vinífera* "uva" cultivadas en Cascas. Región San Martín - La Libertad. Tesis para optar el grado de Bachiller en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 1990.
9. Villanueva, A. 1995. Optimización de la Concentración de azúcar, Tiempo e Inóculo en la Producción de Hidromiel usando *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L5. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias. Universidad Nacional de Trujillo Perú.
10. Olivares, W. Mejora del rendimiento Fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 usando luz UV. Prácticas Pre-Profesionales para optar el título de Biólogo-Microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 1996.
11. Salazar, C. Evaluación del Comportamiento reproductivo y Fermentativo en mosto de melaza de dos cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* (MIT-L51 & Fleishmann). Informe de Prácticas Pre-Profesionales para optar el título de Biólogo- Microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 1996.

12. Pereda, C. Influencia de cuatro fuentes nitrogenadas sobre la Velocidad de Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* MIT-L51. Tesis para optar el título de Biólogo-Microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 1999.
13. Jimenez and T. Benitez. Adaptation of Yeast Cell Membranes to Ethanol. *Applied Environ. Microbiol.* 1987; 53(5):1196-1198.
14. Negre, E. y P. Francot. Manual Práctico de Vinificación y Conservación de los vinos. 3ª. edic. Edit. José Montesó. Barcelona. España.1980.
15. Elizabeth M. R. Rees and Graham G. Stewart J. The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity wort. *J. Inst. Brew.* 1997; 103: 287-291.
16. Poreda Aleksander¹, Antkiewicz Piotr, Tuszyński Tadeusz and Małgorzata Makarewicz Accumulation and Release of Metal Ions by Brewer's Yeast During Successive Fermentations. *J. Inst. Brew.* 115(1), 78-83, 2009.
17. Brian R. Gibson, Stephen J. Lawrence, Jessica P. R. Leclaire¹, Chris D. Powell and Katherine A. Smart. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev.* 2007; 31:535-569.
18. Elizabeth M. R. Rees and Graham G. Stewart Effects of Magnesium, Calcium and Wort Oxygenation on the Fermentative Performance of Ale and Lager Strains Fermenting Normal and High Gravity Worts. *J. Inst. Brew.* 1999; 105 (4):211-217.
19. F.B. Claro, K. Rijsbrack, and E.V. Soares. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ethanol, heat and osmotic stress. *Applied Microbiol.* 2006; 102 (2007): 693-700.
20. Pornthap Thanonkeo, Pattana Laopaiboon, Kaewta Sootsuwan and Mamoru Yamada. Magnesium Ions Improve Growth and Ethanol Production of *Zimomonas mobilis* under Heat Ethanol Stress. *Biotechnol.* 2007; 6 (1):112-115.
21. Walker, G and J Duffus. Magnesium ions and the control of the cell cycle in yeast. *J.Cell.Sci.* 1980; 42: 329-356.
22. B.U. Stambuk, S.L. Alves Jr, C. Hollatz and C.R. Zastrow. Improvement of maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* Letters in Applied Microbiology ISSN 0266.
23. Walker G. M. Magnesium as a stress-protectant for industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. School of Molecular and Life Sciences. University of Abertay Dundee, Dundee DD1 1HG, ROYAUME-UNI. Scotland. 2005.
24. Walker, G. M, The roles of magnesium in biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1994; 14: 311.
25. Blackwell, KJ, JM Tobin and SV Avery. Magnesium uptake and toxicity in magnesium-supplemented and unsupplemented *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 1997; 47: 180-184.
26. Walker, G. M., Chandrasena, G, Birch, R. M. & Maynard, A. I., Proceedings of the 4th Aviemore International Conference on Malting. Brewing and Distilling. Institute of Brewing, London. 1995; 193.
27. Panchal, C. and G. Stewart. Regulatory factors in alcohol fermentations in Currents developments in Teast Research. *Advances in Biotechnology.* Pergamon Press. Canadá. 1980.
28. Stewart, G. and I. Russel. *Yeast Genetics: Fundamental and Applied Aspects.* Spencer Editors. New York. 1983.
29. Stewart, G. Yeast as an industrial microorganism and as an experimental encaryote. In *developments in Industrial Microbiology.* A Publication of Society for Industrial Microbiology. Virginia. USA. 1984.
30. Watson, D. Distilling Yeast. In *Developments in Industrial Microbiology.* A. Publication of Society for Industrial Microbiology. Virginia. USA. 1984.
31. Crueger, W. y A. Crueger. *Biología Industrial: Manual de Microbiología Industrial.* Edit. Acribia, S.A. Zaragoza. España. 1993.
32. Bourgeois, C.; J. Mesele y J. Zuccia. *Microbiología Alimentaria.* Vol. II. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza. España. 1995.
33. Fink, I.; N. Rebogost y M. Dobus. Utilización de la levadura residual de cereza en la lucha contra el hambre. *Biotechnique.* 7:2. 1967.
34. Demain, A. and N. Solomon. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.* American Society for Microbiology. Washington D.C. U.S.A. 1986.
35. Vogt, E.; J. Ludwing. *El Vino. Obtención, elaboración y análisis.* 2ª ed. Edit Acribia S.A. Zaragoza. España. 1986.

ANEXOS

ANEXO 01. Medios de cultivo

a) Composición del agar Sabouraud sacarosado (ASS).

Peptona de caseína(Merk).....	0,1 g
Sacarosa comercial*	4,0 g
Extracto de levadura**.....	0,5 g
Agar – Agar (Merk).....	1,5 g
Agua destilada c.s.p.	100 mL
pH final : 5.5 + 0,2	

b) Composición del caldo Sabouraud sacarosado (CSS).

Peptona de caseína (Merk).....	0,1 g
Sacarosa comercial*	4,0 g
Extracto de levadura**.....	0,5 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml
pH final : 5.5 + 0,2	

*El azúcar rubia doméstica fue utilizado como fuente de sacarosa.

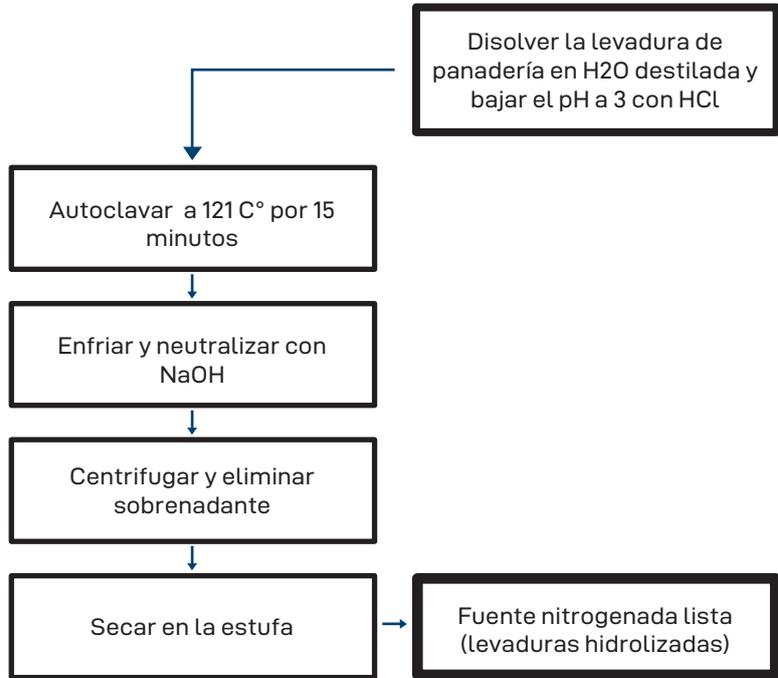
**El extracto de levadura fue sustituido por levadura de panadería procesada (anexo 3).

ANEXO 02. Biorreactores cilíndricos aireados utilizados para evaluar el crecimiento y la producción de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51



1; 2; 3; 4 y 5: Biorreactores cilíndricos aireados de 500 mL de capacidad.
6; 7 y 8: Sistema de aireación
(6: solución de cloruro de sodio al 23%; 7: Solución de sulfato de cobre al 5%; 8: Aireador)

ANEXO 03. Preparación de la fuente nitrogenada a partir de la levadura de panadería.



ANEXO 04. Promedio de recuentos de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 en cámara de Neubauer durante 28 horas de incubación a 26±1 °C en cinco biorreactores cilíndricos aireados conteniendo caldo Saboraud sacarosado, suplementados con magnesio, en cultivo batch.

TIEMPO (Horas)	RECUESTO (Cel/mL)				
	BIORREACTOR				
	1*	2	3	4	5
0	1.53E+05	1.53E+05	1.53E+05	1.53E+05	1.53E+05
4	1.53E+05	1.53E+05	1.53E+05	1.53E+05	1.53E+05
8	2.63E+06	2.87E+06	3.13E+06	2.90E+06	2.83E+06
12	5.53E+06	6.60E+06	6.33E+06	8.30E+06	8.60E+06
16	2.23E+07	2.50E+07	2.43E+07	2.33E+07	2.73E+07
20	5.73E+07	5.17E+07	7.16E+07	6.73E+07	8.20E+07
24	3.10E+08	3.36E+08	3.70E+08	3.20E+08	3.20E+08
28	6.93E+08	7.26E+08	7.40E+08	8.83E+08	8.50E+08

*Biorreactor testigo.

ANEXO 05. Promedio de recuentos de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 en cámara de Neubauer durante 96 horas de fermentación a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ en biorreactores cilíndricos conteniendo caldo Saboraud sacarosado, en cultivo de lote alimentado.

TIEMPO (Horas)	RECuento (Cel/mL)				
	BIORREACTOR				
	1*	2	3	4	5
0	6.93E+08	7.27E+08	7.40E+08	8.53E+08	7.50E+08
8	7.30E+08	7.82E+08	8.17E+08	8.92E+08	8.67E+08
24	5.33E+08	6.17E+08	6.73E+08	7.07E+08	7.28E+08
48	8.53E+07	8.70E+07	9.25E+07	9.43E+07	1.42E+08
72	5.50E+07	6.60E+07	7.40E+07	8.10E+07	9.13E+07
96	4.33E+07	5.23E+07	5.90E+07	6.60E+07	7.80E+07

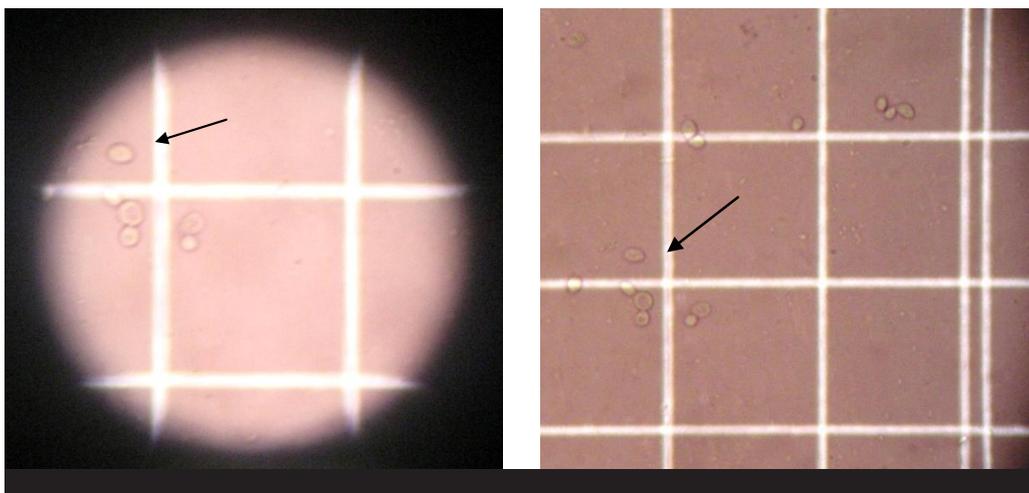
*Biorreactor testigo.

ANEXO 06. Promedio de los valores de pH del caldo Saboraud sacarosado durante la etapa de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51.

TIEMPO (Horas)	Valores de pH				
	BIORREACTOR				
	1*	2	3	4	5
0	3.21	3.21	3.22	3.22	3.22
8	3.21	3.21	3.21	3.22	3.22
24	3.18	3.18	3.18	3.18	3.18
48	3.15	3.17	3.15	3.15	3.16
72	3.13	3.14	3.13	3.12	3.14
96	3.9	3.12	3.11	3.11	3.12

*Biorreactor testigo.

ANEXO 08. Vista microscópica de las células de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 en cámara de Neubauer a 40 x.



ANEXO 07. Porcentaje promedio de etanol producido por *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 en cinco biorreactores cilíndricos durante 96 horas de incubación a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ en biorreactores cilíndricos conteniendo caldo Saboraud sacarosado, en cultivo de lote alimentado.

TIEMPO (Horas)	PRODUCCIÓN DE ETANOL (%)				
	BIORREACTORES				
	1	2	3	4	5
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24	2.00	2.00	2.17	2.83	3.00
48	3.50	3.50	3.50	4.50	4.50
72	4.50	4.67	5.00	5.50	5.67
96	5.00	5.17	5.50	6.00	7.17

ANEXO 09. Pruebas estadísticas descriptivas respecto los promedios de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 (Cel/mL) en caldo Sabouraud sacarosado a $26\pm 1^\circ\text{C}$ durante 28 horas de incubación.

Descriptivos						
Intervalo de confianza						
al 95%						
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Límite inferior	Límite superior
1	8	1,3638E8	2,48241E8	8,77663E7	-7,1151E7	3,4392E8
2	8	1,4356E8	2,61438E8	9,24321E7	-7,5008E7	3,6213E8
3	8	1,5196E8	2,68737E8	9,50128E7	-7,2711E7	3,7663E8
4	8	1,6314E8	3,10374E8	1,09734E8	-9,6341E7	4,2262E8
5	8	1,6138E8	2,98593E8	1,05569E8	-8,8251E7	4,1101E8
Total	40	1,5128E8	2,63992E8	4,17408E7	6,6855E7	2,3571E8

ANEXO 10. Pruebas estadísticas ANOVA respecto a los promedios de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 (Cel/mL) en caldo Sabouraud sacarosado a $26\pm 1^\circ\text{C}$ durante 28 horas de incubación.

	Suma de		Media		
	cuadrados	gl	cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4,197E15	4	1,049E15	0,014	1,000
Intra-grupos	2,714E18	35	7,754E16		
Total	2,718E18	39			

ANEXO 11. Pruebas estadísticas descriptivas respecto los promedios de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 (Cel/mL) en caldo Saboraud Sacarosado a $26\pm 1^\circ\text{C}$ durante 96 horas de fermentación alcohólica.

N	Media	Desviación		Intervalo de confianza al 95%	
		típica	Error típico	Límite inferior	Límite superior
6	3,5560E8	3,29371E8	1,34465E8	9,9465E6	7,0125E8
6	3,8855E8	3,54845E8	1,44865E8	1,6163E7	7,6094E8
6	5,4800E8	3,82302E8	1,56074E8	1,4680E8	9,4920E8
6	4,4888E8	4,08400E8	1,66729E8	2,0294E7	8,7747E8
6	4,4272E8	3,74905E8	1,53054E8	4,9278E7	8,3616E8
30	4,3675E8	3,50778E8	6,40430E7	3,0577E8	5,6773E8

ANEXO 12. Pruebas estadísticas ANOVA respecto a los promedios de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 (Cel/mL) en caldo Saboraud Sacarosado a $26\pm 1^\circ\text{C}$ durante 28 horas de incubación.

	Suma de		Media		F	Sig.
	cuadrados	gl	cuadrática			
Inter-grupos	1,288E17	4	3,220E16		0,234	0,917
Intra-grupos	3,439E18	25	1,376E17			
Total	3,568E18	29				

ANEXO 13. Pruebas estadísticas descriptivas respecto a los promedios de producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 (Cel/mL) en caldo Saboraud sacarosado a $26\pm 1^\circ\text{C}$ durante 28 horas de incubación.

Descriptivos						
					Intervalo de confianza al 95%	
		Desviación			Límite inferior	Límite superior
	N	Media	típica	Error típico		
1	6	2,5000	2,19089	0,89443	0,2008	4,7992
2	6	2,5567	2,26135	0,92319	0,1835	4,9298
3	6	2,6950	2,39294	0,97691	0,1838	5,2062
4	6	3,1383	2,66136	1,08649	0,3454	5,9313
5	6	3,3900	2,96159	1,20907	0,2820	6,4980
Total	30	2,8560	2,35702	0,43033	1,9759	3,7361

ANEXO 14: Pruebas estadísticas ANOVA respecto a los promedios de producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51 (Cel/mL) en caldo Saboraud sacarosado a $26\pm 1^\circ\text{C}$ durante 28 horas de incubación.

ANOVA					
PORCENTAJE DE ETANOL					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3,643	4	0,911	0,145	0,964
Intra-grupos	157,469	25	6,299		
Total	161,111	29			